

基于 CO I 基因序列的蜜蜂属系统发育分析及其舞蹈和筑巢行为进化分析

任晓晓^{1,2}, 贺兴江³, 龚雪阳¹, 赵文正¹, 刘意秋^{1,*}, 董坤^{1,*}

(1. 云南农业大学东方蜜蜂研究所, 云南农业大学动物科学技术学院, 云南省蜜蜂资源可持续利用工程研究中心, 昆明 650201;

2. 贵州省农业科学院蚕业研究所, 贵阳 550006; 3. 贵州省农业科学院现代农业发展研究所, 贵阳 550006)

摘要:【目的】分析蜜蜂属 *Apis* 的系统发育关系,并在此基础上探讨蜜蜂属舞蹈方向、舞蹈声音、营巢环境、巢脾结构的祖先状态和演变过程。【方法】PCR 扩增并测定中国分布的蜜蜂属内东方蜜蜂 *A. cerana*、西方蜜蜂 *A. mellifera*、大蜜蜂 *A. dorsata*、黑大蜜蜂 *A. laboriosa*、小蜜蜂 *A. florea* 和黑小蜜蜂 *A. andreniformis* 的线粒体 CO I 基因序列,并从 NCBI 数据库中下载分布于其他国家或地区的上述 6 种蜜蜂以及绿努蜂 *A. nuluensis*、苏拉威西蜂 *A. nigrocincta*、沙巴蜂 *A. koschevnikovi*、炳式大蜜蜂 *A. dorsata binghami* 的 CO I 同源序列。分别利用最大简约法(MP)、最大似然法(ML)和贝叶斯分析(BI)依据这些序列数据构建蜜蜂属系统发育关系。对蜜蜂属上述种的舞蹈语言和筑巢行为进行编码并作为性状特征标记到系统发育树中,利用简约法对祖先状态进行追溯。【结果】系统发育分析结果表明,蜜蜂属可划分为 3 大类群,即穴居蜜蜂类群(东方蜜蜂、西方蜜蜂、苏拉威西蜂、绿努蜂、沙巴蜂)、大蜜蜂类群(大蜜蜂、黑大蜜蜂)和小蜜蜂类群(小蜜蜂、黑小蜜蜂);小蜜蜂类群更加接近于祖型,大蜜蜂类群和穴居蜜蜂类群是两支单系;炳式大蜜蜂是独立于大蜜蜂和黑大蜜蜂的蜂种,且与黑大蜜蜂的亲缘关系更近。祖先状态重建结果显示:蜜蜂属祖先在露天环境下筑造垂直的单脾,且在传播食物或巢址信息时跳水平方向的无声摆尾舞,有嗡嗡声的舞蹈及筑造复脾是后来形成的。【结论】CO I 基因可作为分子标记用于分析蜜蜂属的舞蹈和筑巢行为的祖先状态及进化过程;蜜蜂筑造复脾、跳有嗡嗡声的舞蹈是后期的适应性进化行为。

关键词: 蜜蜂属; CO I 基因; 系统发育; 舞蹈语言; 筑巢行为

中图分类号: Q963 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)12-1453-09

Phylogenetic analysis of *Apis* (Hymenoptera: Apidae) based on COI gene sequences and an evolutionary analysis of its dancing and nesting behavior

REN Xiao-Xiao^{1,2}, HE Xing-Jiang³, GONG Xue-Yang¹, ZHAO Wen-Zheng¹, LIU Yi-Qiu^{1,*}, DONG Kun^{1,*} (1. Yunnan Provincial Engineering and Research Center for Sustainable Utilization of Honeybee Resources, Eastern Bee Research Institute, College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Sericultural Institute, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China; 3. Institute of Rural Development Research, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

Abstract: 【Aim】To analyze the phylogeny of the genus *Apis*, and to investigate the ancestral state and the evolutionary process of dance direction, dance sound, nesting environment and comb structure in *Apis*

基金项目: 国家自然科学基金项目(31572339, 31460577); 国家现代蜂产业技术体系项目(CARS-44-KXJ13); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养项目(2018HB041)

作者简介: 任晓晓, 女, 1991 年 1 月生, 山东聊城人, 研究实习员, 研究方向为蜜蜂生物学及传粉生物学, E-mail: xiaoxiaoiaoyou@126.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: dongkun19722004@aliyun.com; 327186102@qq.com

收稿日期 Received: 2018-04-26; 接受日期 Accepted: 2018-10-24

based on the phylogenetic relationships. 【Methods】 The COI gene fragments of *A. cerana*, *A. mellifera*, *A. dorsata*, *A. laboriosa*, *A. florea* and *A. andreniformis* distributed in China were amplified by PCR and sequenced. The homologous sequences of COI gene of the above six species in other states or regions and those of *A. nulunsis*, *A. nigrocinta*, *A. koschevnikovi* and *A. dorsata binghami* were downloaded from NCBI databases. The phylogenetic relationships were established using maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) based on these sequence data. The dance language and nesting behavior of each *Apis* species mentioned above were coded and treated as trait markers, and added correspondingly into the phylogenetic trees. The ancestral state was traced with the ML model. 【Results】 The results of phylogenetic analysis demonstrated that *Apis* species can be divided into three clusters, *i. e.*, cavity-nesting honeybees (*A. cerana*, *A. mellifera*, *A. nigrocinta*, *A. nulunsis*, and *A. koschevnikovi*), giant honeybees (*A. dorsata*, and *A. laboriosa*) and dwarf honeybees (*A. florea*, and *A. andreniformis*). The dwarf honeybees are more ancestral, and the giant and cavity-nesting species are monophyletic. Our results also suggest that the giant bee *A. dorsata binghami* is a separate species from *A. dorsata* and *A. laboriosa* and closer to *A. laboriosa*. Prototype inference indicated that ancestral honeybee species nested in the open with a vertical single comb. They disseminate information about food sources and nesting sites using a silent horizontal waggle dance. The behavior of dancing with buzz and nesting with multi-combs appeared subsequently. 【Conclusion】 As a molecular marker, COI gene can be used to analyze the ancestral state and the evolution of dancing and nesting of *Apis* species. The buzzing dance language and multi-comb nesting behavior could be an outcome of adaptive evolution during the later stage.

Key words: *Apis*; COI gene; phylogeny; dance language; nesting behavior

蜜蜂属 *Apis* 在分类学上隶属于膜翅目 (Hymenoptera) 蜜蜂总科 (Apoidea) 蜜蜂科 (Apidae) 蜜蜂族 (Apini), 属内蜜蜂是重要的经济昆虫兼授粉昆虫, 此外还是研究社会性行为的关键模式生物, 具有重要的经济效益、生态效益及科研价值 (曾志将, 2007; Arenas *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015)。目前蜜蜂属内种类分为 3 大类群, 即穴居蜜蜂类群 (东方蜜蜂 *Apis cerana*、西方蜜蜂 *Apis mellifera*、苏拉威西蜂 *Apis nigrocinta*、绿努蜂 *Apis nulunsis*、沙巴蜂 *Apis koschevnikovi*)、小蜜蜂类群 (小蜜蜂 *Apis florea*、黑小蜜蜂 *Apis andreniformis*) 和大蜜蜂类群 (大蜜蜂 *Apis dorsata*、黑大蜜蜂 *Apis laboriosa*), 而大蜜蜂类群中的柄式大蜜蜂 *Apis dorsata binghami* 的分类地位目前仍存在争议 (Alexander, 1991; Engel and Schultz, 1997; Arias and Sheppard, 2005; Raffiudin and Crozier, 2007)。蜜蜂属内种类具有 3 个共同的生物学特性: 营社会性生活、泌蜡筑造具有六角形巢房的巢脾以及贮蜜积极 (曾志将, 2007)。

大蜜蜂和小蜜蜂类群的蜂巢通常是露天筑造的单脾, 但前者的蜂巢通常附着在树枝或崖壁下, 蜂巢竖直垂下, 顶部没有自由空间 (Tan, 2007; Thakar and Tonapi, 2015); 而小蜜蜂类群一般围绕树枝筑

造圆形或椭圆形的蜂巢, 巢脾顶部用来贮存花蜜, 是较平坦的平台 (Barron and Plath, 2017; Beekman and Oldroyd, 2018)。穴居蜜蜂类群喜欢在中空的树干或洞穴中筑造竖直的复脾 (多张巢脾), 但在某些情况下, 西方蜜蜂也会依附树枝筑造露天的蜂巢, 由此可见, 根据环境和可利用的机会不同, 蜜蜂的筑巢行为表现出较大的灵活性 (Engel and Schultz, 1997; Bhagavan *et al.*, 2016)。近年来, 有研究者相继根据蜜蜂生物学信息及分子生物学技术, 对祖先蜜蜂是在腔洞中筑巢还是露天营巢进行了探讨, 但此问题仍然存在很多不确定性 (Raffiudin and Crozier, 2007)。

在社会性昆虫中, 蜜蜂的食物信息传播非常复杂: 工蜂在外采集到较好的蜜源返回蜂巢后, 会在巢脾上做出有规律的运动, 以鼓励其他蜜蜂出巢采集或告知同伴食物的位置信息, 人们将这种规律性运动称为“舞蹈语言” (Dyer, 2003; Toufalia, 2013)。蜜蜂舞蹈通常发生在垂直于地面和水平方向上, 例如: 东方蜜蜂、西方蜜蜂、大蜜蜂和黑大蜜蜂的巢脾是竖直悬挂的, 因此它们的舞蹈是垂直方向的; 而小蜜蜂和黑小蜜蜂的舞蹈发生于巢脾上方的平台上, 是水平方向的 (Beekman *et al.*, 2008; Schürch *et al.*,

2013)。有研究表明,将西方蜜蜂的巢脾水平放置,并在巢脾上方提供一个光源,给予出巢的工蜂饲喂奖励,工蜂回巢后跳起了水平方向的舞蹈,因此有人认为蜜蜂舞蹈的方向与巢脾的方向紧密相关 (Benjamini *et al.*, 2001)。人们针对蜜蜂“舞蹈语言”进行过很多研究,但通常局限于破译舞蹈与食物源之间的关系 (Schürch *et al.*, 2013; Abrol, 2013; Price and Grüter, 2015),对于水平或垂直方向的舞蹈究竟哪一种形式是祖先的特征还未有定论。

蜜蜂舞蹈和筑巢行为的演化过程探究需要基于蜜蜂属的系统发育。自 20 世纪 90 年代以来研究者开始从形态学和分子生物学方面探讨蜜蜂属种类间的系统进化 (Alexander, 1991; Willis *et al.*, 1992; Cameron *et al.*, 1992; Engel and Schultz, 1997; Engel, 2000; Tanaka *et al.*, 2001; Arias and Sheppard, 2005; 曹联飞等, 2012; Takahashi *et al.*, 2018),经常使用的分子标记有线粒体 CO I, CO II 和 ND2 基因,但 Willis 等 (1992) 使用 CO II 基因探究蜜蜂属部分物种的系统发育关系时,结果显示不支持现有沙巴蜂的分类地位,因此他认为以 CO II 基因为分子标记分析蜜蜂属的系统发育具有一定的局限性。CO I 基因具有长度适宜、进化速率慢、富含生物系统发育信号等优点,被广泛用于动、植物系统进化研究 (Hebert *et al.*, 2003), Tanaka 等 (2001) 运用 CO I 基因研究了蜜蜂属内 5 种蜜蜂的系统发育关系,研究结果支持现有蜜蜂的分类地位。

基于上述情况,本研究以蜜蜂属 9 种蜜蜂及分类地位存在争议的炳式大蜜蜂为研究对象,利用 CO I 基因重建蜜蜂属的系统发育关系,并对祖先蜜蜂的舞蹈形式和筑巢行为进行推断,分析蜜蜂舞蹈语言和筑巢行为的演化过程,以期为今后蜜蜂行为特征的进化研究提供参考,并为蜜蜂种类保护及野生蜂种驯化提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与 DNA 数据获取

本实验于 2016 年 5 月–2018 年 1 月在云南农业大学东方蜜蜂研究所分子实验室内完成。所使用的蜜蜂样本分别来源于云南农业大学东方蜜蜂研究所实验蜂场、云南农业大学东方蜜蜂研究所标本室和云南省普洱市野外,包括东方蜜蜂 *A. cerana*、西方蜜蜂 *A. mellifera*、大蜜蜂 *A. dorsata*、黑大蜜蜂 *A. laboriosa*、小蜜蜂 *A. florea* 和黑小蜜蜂 *A.*

andreniformis。野外采集到的样本全部浸泡于无水乙醇中,带回实验室后置于 -80°C 超低温冰箱中保存备用。

考虑到样本采集地的局限性,为增加每种蜜蜂的生态类型,使得重建的系统发育关系更具有代表性和说服力,在本实验采集到的上述 6 种蜜蜂样本中每种每个采样点选择 1 头用于测定 CO I 基因;再从 GenBank 数据库下载相关的蜜蜂 CO I 基因序列用于比较分析,并以蜜蜂科麦蜂族 (Meliponini) 麦蜂 *Melipona scutellaris* CO I 基因 (GenBank 登录号: KP202303) 作为系统发育分析的外群。本实验自测和下载序列的详细信息见表 1。

1.2 CO I 基因扩增及序列测定

取 1.1 节蜜蜂样本的胸部肌肉,利用酚/氯仿法提取基因组 DNA,用 TE 溶液保存提取成功的 DNA,放置于 -80°C 超低温冰箱中保存备用 (Zhao *et al.*, 2017)。

通过 PCR 扩增 CO I 基因片段,本实验中使用的线粒体 CO I 基因特异性扩增引物为 LCO1490 (forward): 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'; HCO2198 (reverse): 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Tanaka *et al.*, 2001)。由生工生物工程 (上海) 有限公司合成后,10 000 r/min 离心 5 min,用 TE 溶液溶解至终浓度为 20 mmol/ μL ,分装后放置于 -80°C 超低温冰箱中保存备用。

PCR 反应体系 (40 μL): DNA 模板 200 ng, 10 $\times$ 反应缓冲液 4 μL , dNTPs 4 μL , Taq 聚合酶 2 U, 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 2 μL 。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 终止反应。PCR 产物纯化后送上海生工生物工程有限公司进行双向测序。

1.3 序列比对及系统发育分析

测序完成后,首先利用 SeqMan 程序对正、反向 CO I 基因序列峰图进行检查、校正、修剪并生成一致序列。将生成的一致序列提交到 NCBI 的 BLAST 检索,与已提交序列进行比对,核实是否为目的片段,之后将所测 CO I 基因的 DNA 序列上传至 GenBank (表 1)。联合 GenBank 下载的此段同源序列,将 1.2 节 PCR 扩增获得的以及从 GenBank 下载的 26 条 CO I 基因序列导入 MEGA6.0 中,在默认参数下进行 Clustal W 计算,并采用最大简约法 (maximum parsimony, MP) 和最大似然法 (maximum likelihood, ML) 构建系统发育树,系统树各分支的置

表 1 COI 基因序列来源
Table 1 Sources of COI gene sequences

种名 Species	样本 Samples	采集地 Collecting locality	GenBank 登录号 GenBank accession no.
东方蜜蜂 <i>Apis cerana</i>	<i>Apis cerana</i> 1	中国云南 Yunnan, China	MH138082 ^a
	<i>Apis cerana</i> 2	泰国 Thailand	AF153106 ^b
	<i>Apis cerana</i> 3	越南 Vietnam	KM066955 ^b
西方蜜蜂 <i>A. mellifera</i>	<i>Apis mellifera</i> 1	中国云南 Yunnan, China	MH138083 ^a
	<i>Apis mellifera</i> 2	俄罗斯 Russia	MF100924 ^b
	<i>Apis mellifera</i> 3	摩洛哥 Morocco	KY926883 ^b
大蜜蜂 <i>A. dorsata</i>	<i>Apis dorsata</i> 1	中国云南 Yunnan, China	MH138081 ^a
	<i>Apis dorsata</i> 2	马来西亚 Malaysia	AY012725 ^b
	<i>Apis dorsata</i> 3	马来西亚 Malaysia	DQ016080 ^b
炳式大蜜蜂 <i>A. dorsata binghami</i>	<i>Apis dorsata binghami</i>	印度尼西亚 Indonesia	DQ020234 ^b
小蜜蜂 <i>A. florea</i>	<i>Apis florea</i> 1	中国云南 Yunnan, China	MH138080 ^a
	<i>Apis florea</i> 2	泰国 Thailand	DQ016083 ^b
	<i>Apis florea</i> 3	中国云南 Yunnan, China	KC170303 ^b
黑大蜜蜂 <i>A. laboriosa</i>	<i>Apis laboriosa</i> 1	中国云南 Yunnan, China	MH138079 ^a
	<i>Apis laboriosa</i> 2	尼泊尔 Nepal	AP018039 ^b
黑小蜜蜂 <i>A. andreniformis</i>	<i>Apis andreniformis</i> 1	中国云南 Yunnan, China	MH138078 ^a
	<i>Apis andreniformis</i> 2	未知 Unknown	EU163123 ^b
	<i>Apis andreniformis</i> 3	印度 India	KF736157 ^b
沙巴蜂 <i>A. koschevnikovi</i>	<i>Apis koschevnikovi</i> 1	马来西亚 Malaysia	AP017643 ^b
	<i>Apis koschevnikovi</i> 2	马来西亚 Malaysia	AY754732 ^b
	<i>Apis koschevnikovi</i> 3	马来西亚 Malaysia	DQ016101 ^b
绿努蜂 <i>A. nulunsis</i>	<i>Apis nulunsis</i> 1	马来西亚 Malaysia	MF565375 ^b
	<i>Apis nulunsis</i> 2	马来西亚 Malaysia	AF153099 ^b
	<i>Apis nulunsis</i> 3	马来西亚 Malaysia	AP018157 ^b
苏拉威西蜂 <i>A. nigrocinta</i>	<i>Apis nigrocinta</i>	印度尼西亚 Indonesia	KY799147 ^b
麦蜂 <i>Melipona scutellaris</i>	<i>Melipona scutellaris</i>	未知 Unknown	KP202303 ^b

^a本实验自测 Obtained from this study; ^b自 GenBank 下载 Downloaded from GenBank.

信度由 Bootstrap 1 000 次重抽样检验。

使用 MrBayes 3. 1. 2 进行贝叶斯系统发育分析 (BI),在分析前使用 MrModeltest2. 3 检测序列的最适碱基替代模型。BI 分析采用蒙特卡罗马尔科夫链式反应 (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) 运行 20 000 000 代,迭代多次直至 BI 分析的收敛值 ≤ 0. 01,每 1 000 代取样 1 次,将最初的 10 000 个样本作为老化样本舍弃,而将剩余的 10 000 个样本用作后续的分析。总结得到的一致树,其节点的可靠性采用后验概率 (posterior probability, PP) 加以评估 (Huelsenbeck *et al.*, 2001)。

1.4 蜜蜂行为特征祖先状态重建

为了追溯蜜蜂属舞蹈语言和筑巢行为的进化过程,首先对蜜蜂属舞蹈的声音、方向及营巢环境、巢脾结构特征进行赋值(表 2)。将这些特征作为性状标记到 1. 3 节 BI 分析获得的系统发育树中,运用 Mesquite3. 4. 0 程序对蜜蜂属 9 种蜜蜂、炳式大蜜蜂

及麦蜂 *M. scutellaris* 的行为特征的祖先状态进行重建,采用了基于分支树追溯性状以及简约法祖先状态重建。

2 结果

2.1 蜜蜂属的系统发育

基于本实验自测和下载自 GenBank 的 CO I 基因序列(表 1),运用 MEGA6. 0 (使用最大简约法 (MP) 和最大似然法 (ML)) 及 MrBayes 3. 1. 2 软件,以麦蜂 *M. scutellaris* 为外群,重建了蜜蜂属内 9 种蜜蜂的系统进化关系,结果得到了相似的拓扑结构,都支持将蜜蜂属划分为 3 个大类群:穴居蜜蜂类群、大蜜蜂类群和小蜜蜂类群,其中小蜜蜂类群位于进化树的基部(图 1: A; 图 2),说明其最接近于祖先类型;大蜜蜂类群和穴居蜜蜂类群为后来分化形成,这与基于形态学性状的分类结果一致(图 1 和 2)。

表 2 蜜蜂属舞蹈语言和筑巢行为特征赋值

特征赋值 Coding of characters	行为特征 Behavioral characters			
	舞蹈的方向 Direction of dancing	舞蹈的声音 Sound during dance	营巢环境 Nesting environment	巢脾结构 Nest structure
1	不跳舞 ^a No dancing	不跳舞 ^a No dancing	露天营巢 ^{b, c} Open nesting	水平巢脾 ^{d, e} Horizontal combs
2	水平方向 ^{f, g, h} Horizontal direction	无声的舞蹈 ^g Silent dance	洞穴营巢 ^{e, i} Cavity nesting	位于支持物下方的竖直单脾 ^{c, d, j} One vertical comb beneath support
3	垂直于地面 ^a Vertical direction	有嗡嗡声的舞蹈 ^b Dancing with buzz	—	环绕支持物的竖直单脾 ^{i, k} One vertical comb wrapped around support
4	—	—	—	位于支持物下方的竖直复脾 ^{a, c} Several vertical combs beneath support
?	未知 Unknown	未知 Unknown	—	—

–: 无性状 No character. ^aRaffiudin and Crozier, 2007; ^bEngel and Schultz, 1997; ^c曾志将, 2007; ^dTan, 2017; ^eThakar and Tonapi, 2015; ^f周冰峰, 2002; ^gBeekman *et al.*, 2008; ^hSchürch *et al.*, 2013; ⁱBarron and Plath, 2017; ^jAbrol, 2013; ^kBeekman and Oldroyd, 2018.

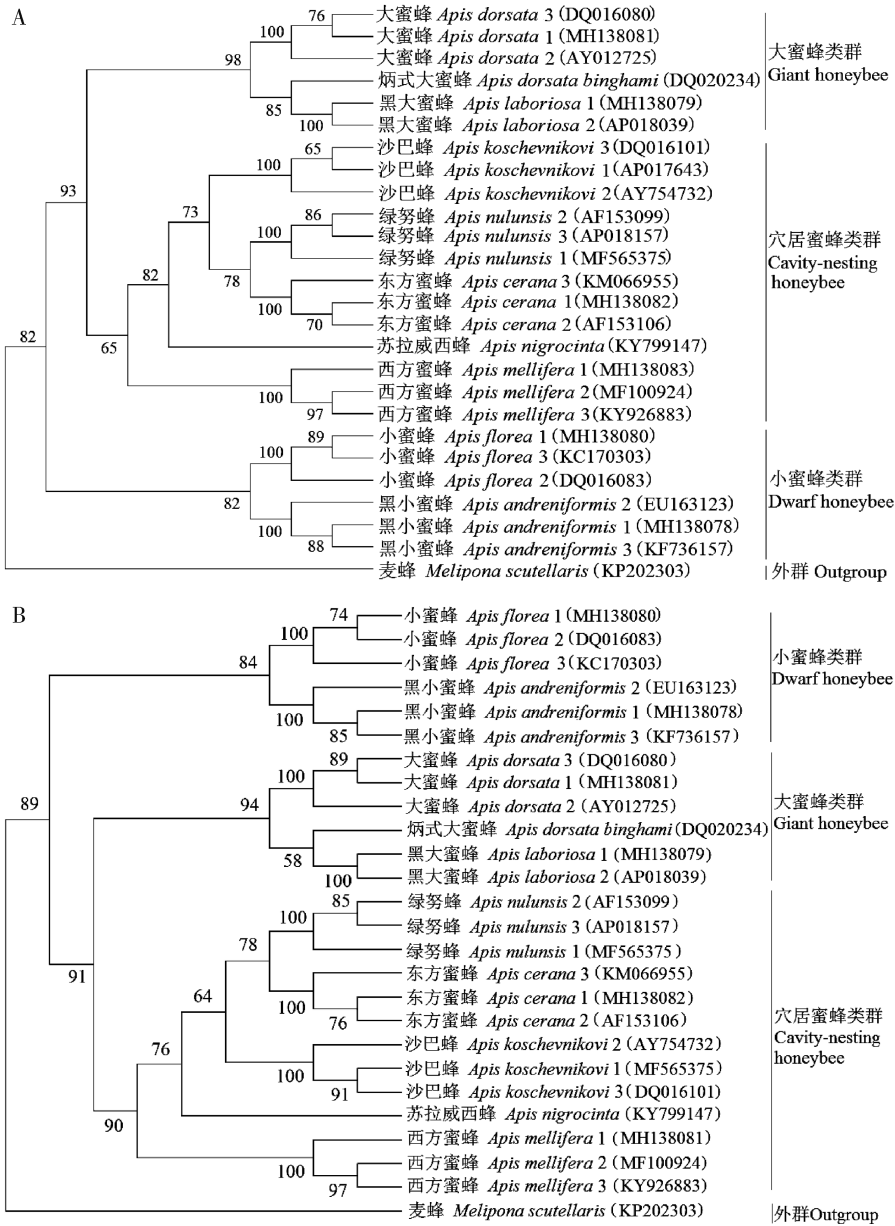


图1 最大简约法和最大似然法构建的基于 CO I 基因序列的蜜蜂属系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees of the genus *Apis* based on the COI gene sequences using maximum parsimony and maximum likelihood. A: MP 树 Parsimony tree; B: ML 树 Likelihood tree. 图中分支处数字表示自展支持率 Values along branches in the figure represent the parsimony bootstrap.

从系统进化分析的结果可以看出,在穴居蜜蜂类群中,东方蜜蜂、绿努蜂、沙巴蜂和苏拉威西蜂紧密地聚集在一起:在 MP 和 ML 分析中东方蜜蜂与绿努蜂聚为一支,自展支持率为 78% (图 1: A, B),而在 BI 分析中,东方蜜蜂与苏拉威西蜂聚为一支,BI 后验概率为 0.76 (图 2),却都显示为可靠的分组。

在大蜜蜂类群中,MP 和 ML 分析显示柄式大蜜蜂与黑大蜜蜂的亲缘关系更近,MP 分析中两者聚类的自展支持率较高,为 85%,显示聚类可靠 (图 1: A);但在 ML 分析中此节点的自展支持率仅为 58% (图 1: B);而 BI 分析显示,柄式大蜜蜂是独立于黑大蜜蜂和大蜜蜂之外的蜂种,但后验概率仅为 0.53,支持率较低 (图 2)。

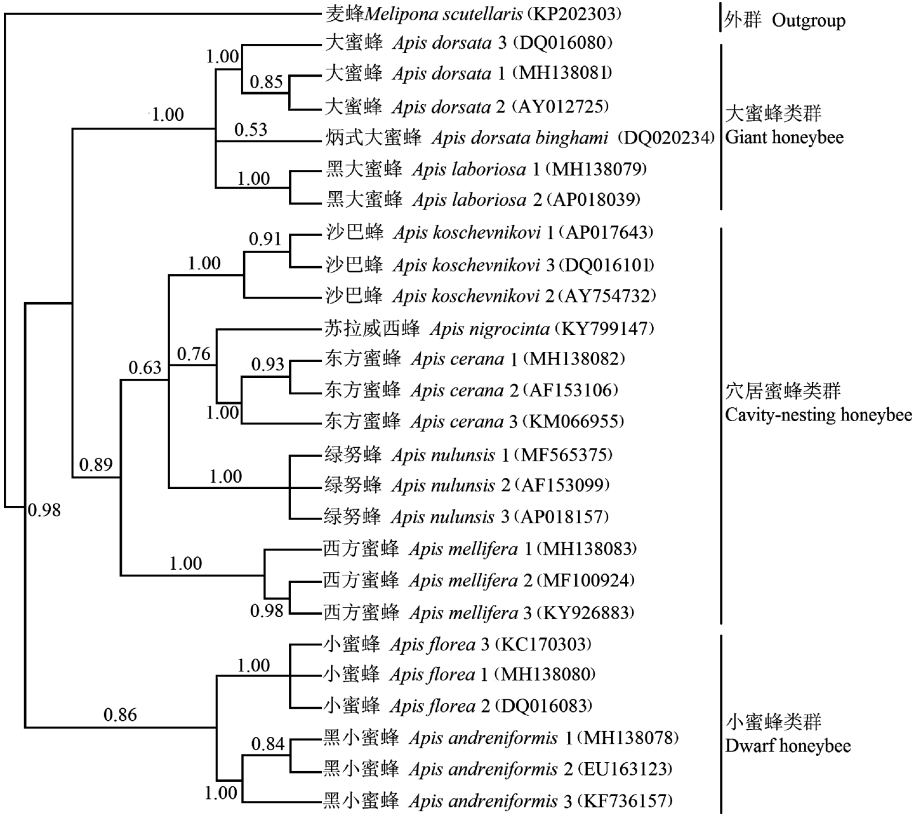


图 2 贝叶斯法构建的基于 COI 基因序列的蜜蜂属系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the genus *Apis* based on the COI gene sequences using Bayesian inference

图中分支处数字表示 BI 树的后验概率 Values along branches in the figure represent the Bayesian posterior probabilities.

2.2 蜜蜂行为祖先状态重建

由于 BI 分析法得到的系统发育树中,有 45% 的节点得到了最大后验概率 (PP = 1.00),85% 的节点得到了 0.80 以上的后验概率;而 MP 和 ML 分析中,获得最大自展值的节点仅占 33.3%,自展支持率大于 80% 的节点占比均为 75%。因此,基于 BI 分析得到的系统发育树更加可靠。所以,本实验将 BI 树运用于蜜蜂属的舞蹈语言及筑巢行为的祖先状态重建。

2.2.1 蜜蜂舞蹈语言:舞蹈方向的状态重建结果表明,蜜蜂族和麦蜂族的共同祖先中,可能既有依靠气味痕迹传递食物和巢址信息,也有依靠舞蹈传播的。

蜜蜂属祖先的舞蹈最可能是水平方向的,但在穴居蜜蜂和大蜜蜂类群的共同祖先处,舞蹈方向发生了第一次演变,转变成垂直方向,之后一直处于稳定状态 (图 3: A)。

蜜蜂舞蹈声音的祖先状态推断结果如图 3 (B) 所示。从图中可以看出,祖先蜜蜂的舞蹈最可能是无声的,带有嗡嗡声的蜜蜂舞蹈属于派生行为,此状态的演化同样是在发生于穴居蜜蜂与大蜜蜂类群的共同祖先,由无声舞蹈转变为带有嗡嗡声的舞蹈,而黑大蜜蜂的舞蹈声音仍然遵循祖先状态。

2.2.2 蜜蜂筑巢行为:图 4 (A) 为蜜蜂营巢环境的祖先状态重建结果,图中显示,蜜蜂族与麦蜂族的共

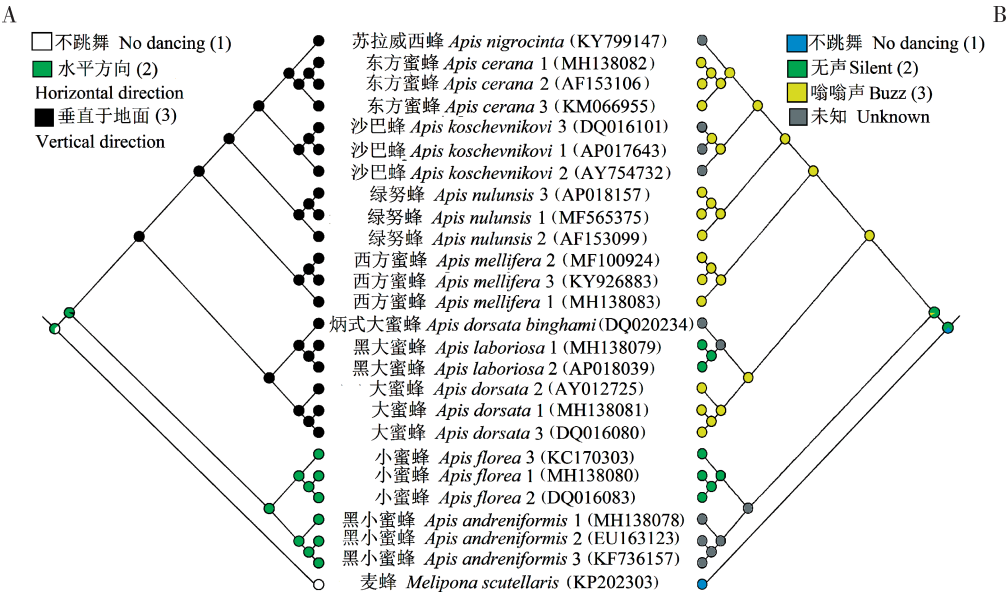


图 3 基于 BI 分析构建的蜜蜂舞蹈的进化图

Fig. 3 Evolution of honeybees dance based on the Bayesian topology

A: 舞蹈方向 Direction of dancing; B: 舞蹈的声音 Sound during dance. 图例中数字代表特征赋值。Numbers in the figure legend represent the character state values.

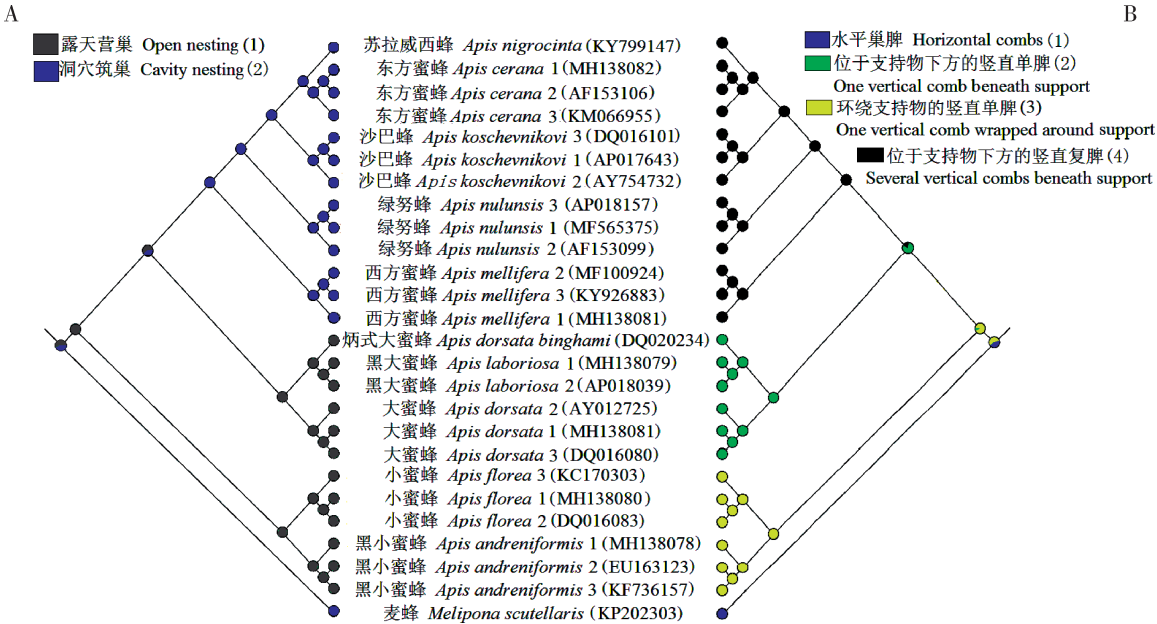


图 4 基于 BI 分析构建的蜜蜂筑巢行为的进化图

Fig. 4 Evolution of honeybees nesting behavior based on the Bayesian topology

A: 露天筑巢或洞穴筑巢 Open nesting or cavity nesting; B: 巢脾的结构 Comb structure. 图例中数字代表特征赋值。Numbers in the figure legend represent the character state values.

同祖先既有露天营巢也有洞穴筑巢的。小蜜蜂类群的祖先是露天营巢的,而大蜜蜂类型的祖先既有露天营巢也有洞穴筑巢的。穴居蜜蜂类群的祖先是洞穴筑巢的,露天营巢的行为消失。

蜂巢构造祖先状态推断结果显示,蜜蜂属祖先筑造垂直的单脾,垂直复脾属于蜜蜂进化过程中的

派生状态,在穴居蜜蜂的祖先处发生此种演化(图 4: B)。蜜蜂筑巢结构未发生过逆转变。

3 讨论

本实验以 CO I 基因部分片段为分子标记,对蜜

蜂属的系统发育关系进行了重建,MP 和 ML 分析得到的系统发育树,其拓扑结构与曹联飞等(2012)利用 *CO II* 和 *ND2* 等基因得到的蜜蜂属系统发育关系相似,但在沙巴蜂的分类地位上略有不同。本实验中,沙巴蜂与东方蜜蜂的亲缘关系比苏拉威西蜂与东方蜜蜂的更近,推测沙巴蜂从东方蜜蜂中分化的时间比苏拉威西蜂晚,而曹联飞等(2012)的结果显示苏拉威西蜂的分化晚于沙巴蜂。推测产生这一差异的主要原因在于使用的分子标记不同,*CO I* 基因是目前动物系统进化研究应用最频繁的分子标记之一,具有相对保守却富含生物系统发育信号等优点,用于研究种间的系统演化关系具有很大的优越性(Hebert *et al.*, 2003),而 Willis 在使用 *CO II* 基因对蜜蜂属部分种类进行系统发育重建时,发现由于 *CO II* 基因进化速率较快等原因,并不适用于蜜蜂属的系统遗传学研究(Willis *et al.*, 1992)。因此我们认为本研究重建的蜜蜂属系统发育关系更加可靠。

目前炳式大蜜蜂的分类地位仍然不太明确,虽然有学者把炳式大蜜蜂归为大蜜蜂的一个亚种(Hepburn and Radloff, 2011),但在本实验的 MP 和 ML 分析中,炳式大蜜蜂与黑大蜜蜂聚为一支,且在 MP 分析中得到了 85% 的自展支持率。BI 分析显示炳式大蜜蜂是与大蜜蜂、黑大蜜蜂并列的物种,但是后验概率较低(0.53)。这与 Lo 等(2010)的研究结果一致,其利用 BI 分析探究大蜜蜂类群中的系统发育关系时发现炳式大蜜蜂是独立于大蜜蜂和黑大蜜蜂之外的物种,且与黑大蜜蜂的亲缘关系更近,后验概率为 0.68。但由于 GenBank 中 *CO I* 基因的此段同源序列较少,炳式大蜜蜂的分类地位仍需进一步探讨。

蜜蜂的摆尾舞被认为是真正具有象征意义的通讯方式,因为这种舞蹈将食物源的时间和空间信息都进行了编码,即摆尾的时间代表食物的远近,蜜蜂头部的朝向与重力线所成的角度代表食物位置与太阳所成的角度(Abrol, 2013)。本研究的结果显示,蜜蜂属祖先的摆尾舞最可能发生在水平方向上,最接近祖型的小蜜蜂类群在传递食物和巢址信息时,常在巢脾上方的平台上作摆腹直线跑动,而运动的朝向直接指示了目标的方位(周冰峰, 2002),这相比于穴居蜜蜂和大蜜蜂类群依赖重力来传递方向信息无疑是非常节省能量的。但随着蜜蜂的进化,摆尾舞由水平方向进化为垂直方向,产生这一进化的原因还不明确,仍需要深入研究。属内祖先蜜蜂的舞蹈是无声的,但大蜜蜂与穴居蜜蜂的共同祖先却

跳有嗡嗡声的摆尾舞,这可能是一种适应性进化。小蜜蜂类群和黑大蜜蜂的舞蹈在白天进行,因此它们依靠视觉来接受舞蹈传递的信息即可;而大蜜蜂和穴居蜜蜂虽多数在白天舞蹈,但有时也会发生在夜晚(Abrol, 2013),且穴居蜜蜂的蜂巢内通常光线非常暗,所以这两者除依靠视觉外可能还要依靠听觉接受舞蹈信息。

穴居蜜蜂类群倾向于在树木的腔洞或洞穴中筑造复脾,这是一种衍生的行为,因为祖先蜜蜂是在开放的环境中筑造单脾,这一结果与 Raffiudin 和 Crozier(2007)的研究结果一致。比较原始的小蜜蜂类群和大蜜蜂类群分布于亚洲热带地区,分布地的年平均气温在 12℃ 以上,整群蜜蜂只有一片巢脾,以蜜蜂覆盖巢脾的方式就能维持巢温(曾志将, 2007)。随着蜜蜂分布地的扩张,有些种群开始登陆温带地区,此地区冬季的温度较低,对露天营巢的蜜蜂生存提出了较大的挑战。因此在洞穴内筑造复脾是蜜蜂种群的一大进步,由若干片巢脾组成的复脾不仅使蜂巢内部环境更加稳定,且避免阳光直射对蜂儿的发育也十分有利;洞穴筑巢使得蜂群与外界的接触面积减小,在很大程度上减少了外界环境(包括天敌在内)的干扰,并且随着防卫蜂的数量减少,采集蜂的数目增加,为蜜蜂完整社会性的形成也提供了可能(曾志将, 2007)。

参考文献 (References)

- Abrol DP, 2013. Asiatic Honeybee *Apis cerana*. Springer Netherlands Press, Dordrecht, Holland.
- Alexander BA, 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Apis* (Hymenoptera: Apidae). *Entomol. Soc. Am.*, 84(2): 137–149.
- Arenas A, Ramírez GP, Balbuena MS, Farina WM, 2013. Behavioral and neural plasticity caused by early social experiences: the case of the honeybee. *Front. Physiol.*, 4: 41.
- Arias MC, Sheppard WS, 2005. Phylogenetic relationships of honeybees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 37(1): 25–35.
- Barron AB, Plath JA, 2017. The evolution of honey bee dance communication: a mechanistic perspective. *J. Exp. Biol.*, 220(Pt 23): 4339–4346.
- Beekman M, Gloag RS, Even N, Wattanachaiyingchareon W, Oldroyd BP, 2008. Dance precision of *Apis florea* – clues to the evolution of the honeybee dance language? *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 62(8): 1259–1265.
- Beekman M, Oldroyd BP, 2018. Different bees, different needs: how nest-site requirements have shaped the decision-making processes in homeless honeybees (*Apis* spp.). *Philos. R. Soc. B.*, 373(1746):

- 1 – 9.
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkaw N, Golani I, 2001. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain Res.*, 125(1): 279 – 284.
- Bhagavan H, Muthmann O, Brockmann A, 2016. Structural and temporal dynamics of the bee curtain in the open-nesting honey bee species, *Apis florea*. *Apidologie*, 47(6): 749 – 758.
- Cameron SA, Derr JN, Austin AD, Woolley JB, Wharton RA, 1992. The application of nucleotide sequence data to phylogeny of the Hymenoptera; a review. *J. Hym. Res.*, 1(6): 63 – 79.
- Cao LF, Niu DF, He SY, Kuang HO, Hu FL, 2012. Phylogenetic relationships of honeybees (Hymenoptera: Apinae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Hereditas (Beijing)*, 34(8): 1057 – 1063. [曹联飞, 牛德芳, 和绍禹, 匡海鸥, 胡福良, 2012. 基于线粒体和核基因序列的蜜蜂属系统发育分析. 遗传, 34(8): 1057 – 1063]
- Dyer FC, 2003. The biology of the dance language. *Annu. Rev. Entomol.*, 47: 917 – 949.
- Engel MS, 2000. A new interpretation of the oldest fossil bee (Hymenoptera: Apidae). *Am. Mus. Novit.*, (3296): 1 – 11.
- Engel MS, Schultz TR, 1997. Phylogeny and behavior in honeybees (Hymenoptera, Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 90(1): 43 – 53.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.*, 270(1512): 313 – 321.
- Hepburn HR, Radloff SE, 2011. Honeybees of Asia. Springer, Berlin. 51 – 67.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP, 2001. Reverend Bayes meets Darwin: Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294(5550): 2310 – 2314.
- Lo N, Gloag RS, Anderson DL, Oldoryd BP, 2010. A molecular phylogeny of the genus *Apis* suggests that the Giant Honey Bee of the Philippines, *A. breviligula* Maa, and the Plains Honey Bee of southern India, *A. indica* Fabricius, are valid species. *Syst. Entomol.*, 35(2): 226 – 233.
- Price RI, Grüter C, 2015. Why, when and where did honey bee dance communication evolve? *Front. Ecol. Evol.*, 3: 125.
- Raffiudin R, Crozier RH, 2007. Phylogenetic analysis of honeybee behavioral evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 41(1): 543 – 552.
- Schürch R, Couvillon MJ, Burns DDR, Tasman K, Waxman D, Ratnieks FLW, 2013. Incorporating variability in honey bee waggle dance decoding improves the mapping of communicated resource locations. *J. Comp. Physiol. A*, 199(12): 1143 – 1152.
- Silva IPD, Oliveira FAS, Pedroza HP, Gadelha ICN, Melo MM, Soto-Blanco B, 2015. Pesticide exposure of honeybees (*Apis mellifera*) pollinating melon crops. *Apidologie*, 46(6): 703 – 715.
- Takahashi JI, Deowanish S, Okuyama H, 2018. Analysis of the complete mitochondrial genomes of two dwarf honeybee species, *Apis florea* and *Apis andreniformis* (Insecta: Hymenoptera: Apidae), in Thailand. *Mitoch. DNA Part B Resour.*, 3(1): 350 – 353.
- Tan NQ, 2007. Biology of *Apis dorsata* in Vietnam. *Apidologie*, 38(3): 221 – 229.
- Tanaka H, Roubik D, Kato M, Liew F, Gunsalam G, 2001. Phylogenetic position of *Apis nuluensis* of northern Borneo and phylogeography of *A. cerana* as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Insectes Soc.*, 48(1): 44 – 51.
- Thakar CV, Tonapi KV, 2015. Nesting behaviour of Indian honeybees, differentiation of worker, queen and drone cells on the combs of *Apis dorsata* Fab. *Bee World*, 42(3): 61 – 62.
- Toufailia HA, Couvillon MJ, Ratnieks FLW, Grüter C, 2013. Honey bee waggle dance communication: signal meaning and signal noise affect dance follower behaviour. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 67(4): 549 – 556.
- Willis LG, Winston ML, Honda BM, 1992. Phylogenetic relationships in the honeybee (genus *Apis*) as determined by the sequence of the cytochrome oxidase II region of mitochondrial DNA. *Phylogenet. Evol.*, 1(3): 169 – 178.
- Zeng ZJ, 2007. Biology of Honeybees. China Agriculture Press, Beijing. [曾志将, 2007. 蜜蜂生物学. 北京: 中国农业出版社]
- Zhao WZ, Wang M, Liu YQ, Gong XY, Dong K, Zhou DY, He SY, 2017. Phylogeography of *Apis cerana* populations on Hainan island and southern mainland China revealed by microsatellite polymorphism and mitochondrial DNA. *Apidologie*, 48(1): 63 – 74.
- Zhou BF, 2002. Management and Feeding of Honeybees. Xiamen University Press, Xiamen, Fujian. [周冰峰, 2002. 蜜蜂饲养管理学. 福建厦门: 厦门大学出版社]

(责任编辑: 马丽萍)